

The Korean Intellectual Property Office (KR)
Publication of Application (A)

(51) Int.Cl.

C12Q 1/68 (early disclosure)

(11) Publication No	10-2000-0072201		
(43) Publication Date	2000-12-05		
(21) Application No	10-2000-0047468		
(22) Application Date	2000-08-17		
(74) Agent	Jong-U Lee Won-Yong Park	(72) Inventor	Hui-Tae Kim
(71) Applicant	Hui-Tae Kim		

Requested

(54) A METHOD FOR DIAGNOSING FRAGILE-X SYNDROME USING DNA PROBES

● Abstract

Machine Translation

Human Translation

PURPOSE: Provided is a diagnosis method of Fragile-X-syndrome using various DNA probes, which bind with nucleic acid sequence of FMR1 gene related to fragile-X syndrome. Fragile-X-syndrome is diagnosed accurately in a short time by detecting repeat frequency of CGN(n) and CGG sequences in FMR1 gene of the nucleic acid specimen.

CONSTITUTION: A diagnosis method of Fragile-X-syndrome using various DNA probes is characterized by comprising the following steps of: (i) decomposing nucleic acid specimens by treating with DNA restriction enzyme which specifically cleaves the environs of FMR1 gene; (ii) adding DNA probe of sequence CGG(m) and GCC(m) whereto the first label material is adhered (m is 3-10 of integer, the times whose CGG and GCC are repeated) and followed by mixing; (iii) adding 2 kinds of sense and anti-sense DNA probes whereto the second label material capable of binding with internal sequence of FMR1 gene is adhered and followed by mixing; (iv) adding 2 kinds of sense and anti sense DNA probes capable of binding with internal sequence of FMR1 gene, whereto biotin is adhered and followed by mixing; (v) thermal denaturation by heating the nucleic acid associated DNA probes; (vi) reacting so as to bind the denatured nucleic acid with DNA probes specifically; (vii) fixing nucleic acid associated DNA probe on micro well plate by injecting into micro well plate where streptavidin is immobilized on the surface; (viii) removing non binding nucleic acid and DNA probe by washing micro well plate; (ix) measuring the nucleic acid amount which is fixed on micro well plate by reading the second label material; (x) measuring the repeat sequence CGG(n) in nucleic acid specimen by reading the first label material; (xi) enumerating the CGG repeat number n in nucleic acid specimen from the result of (ix) and (x).

COPYRIGHT 2001 KIPO

● Representative Drawing(s)

Fig. 3

● Keyword(s)

The fragile-X syndrome, FMR1 gene, DNA probe, repetitive sequence, tracer, fluorescence dye, biotin,

streptavidin, microwell plate, nucleic acid sample material.

● Description

◆ Brief Explanation of the Drawing(s)

- 2 Fig. 1 is a drawing about the membrane showing the result obtained with the conventional Southern blotting technique.
- 3 Fig. 2 is a drawing to the agarose or the polyacrylamide gel showing the result obtained with the conventional PCR technique.
- 4 Fig. 3 is a side sectional view of the microwell plate tube showing the state adhering on the microwell plate (micro well plate) in which DNA probe combined in the nucleic acid sample material are adhered and the streptavidin is adhered that a method is extracted by a method from the normal person.
- 5 Fig. 4 is a side sectional view of the microwell plate tube showing the state adhering on the DNA probe, and the microwell plate in which a streptavidin is adhered combined in the nucleic acid sample material that a method is extracted by a method from the fragile-X syndrome patient.

◆ Details of the Invention

● Purpose of the Invention

The Technical Field to which the Invention Belongs and the Prior Art in that Field

- 6 The present invention relates to the method the extra-large relating within the nucleic acid sample material to the fragile-X syndrome existing detects the nucleic acid sequence, and in that way for diagnosing the fragile-X syndrome, more particularly, to the method it uses various kinds of DNA probes uniting with the FMR1 in gene nucleic acid sequence which is the gene related to the fragile-X syndrome, and it detects the CGG number of occurrence of the FMR1 in gene sequence CGG (n) in the nucleic acid sample material extracted from the listed person for test, and in that way for giving a diagnosis of the fragile-X syndrome incidence or not.
- 7 The fragile-X syndrome occupies 20% or 15 of the whole oligophrenia among the hereditary problems showing the mental retardation to the most common disease. And it is the serious disease showing the spirit retardation including the formerly LDH, the lingual disability, the emotional anxiety etc. in the externally *** which is an unbalanced as the symptoms.
- 8 In the first Exxon (exon) of the FMR1 gene existing in the research result toward the pathogenesis of an otopathy, and X chromosome image, it had the inverted repeat CGG (n) in which 3 nucleotides of CGG was consecutively repeated with several times. And it be the important reason in which the change of the etc. in which the number of occurrence n of this sequence increased caused the fragile-X syndrome, this CGG sequence was repeated in case of the normal person less than 60 time. But it did not show a symptom but this sequence was repeated in the future generations in case of the cofactor (carrier) inheriting an otopathy with about 60-200 time. And the full mutation occurred and with being the fragile-X syndrome patient [the reference : Am J Med Genet, the Kaufmann WE, and Reiss AL 88 (1) :11-24s (1999, 2)] showing the mental retardation symptoms the case in which the CGG sequence was repeated over 200 time was reported.
- 9 Presently, different methods are used as the method for analyzing the CGG number of occurrence of the FMR1 in gene sequence CGG (n). But it is the consequence which is not generalized due to the difficulty of the result reading phase and the technical difficulty.
- 10 The Southern blotting technique [the reference : Hum Genet, vaisanen ML, kahkonen M, leisti J 93 (2) :143- 7s (1994, 2)] adhering to the specific nucleic acid probe to the FMR1 gene to the existing method for diagnosing the fragile-X syndrome and confirms the length of the repetitive sequence CGG (n) and PCR technique [reference : Clin Genet, hecimovic S, barisic I, muller A, petkovic I, baric I, ligutic I, pavelic K 52 (3): 147: - 52 (3): 147: -- 54s (1997, 9)] etc. are used amplifies the repetitive sequence CGG (n) and analyzes the size of an outcome.
- 11 After it disassembles and the Southern blotting technique using the middle, and the specific nucleic acid probe cuts the specific site of the FMR1 gene DNA extracted from a sample in the specific DNA restriction enzyme with processing,

after it electrophoreses at a gel-like and these DNA fragments are put into on a membrane, after the FMR1 gene peculiar probe in which here a tracer is adhered is added and it reacts with nucleic acid combination, it is the method for detecting the variation whether or not and about the of the FMR1 gene within a sample by analyzing the size of DNA fragments through the tracer read. The test process is complicated and it has many defect including the difficulty of the accomplishment award etc. with the problem that this method performs the total process but minimum 48 hours are required and the testing time is elementarily overly long.

- 12 The PCR amplification technique which is the another technique extracts the nucleic acid from the test cell. By using the specific primer which here unites with the both sides of the FMR1 in gene CGG repeat portion and can perform PCR, it amplifies. Because the GC ratio of the amplification target part nearly comes up to 100%, in this case, it is impossible to an amplification to the technique analyzing the length of the nucleic acid amplified through the electrophoresis method and measures the length of the repetitive sequence CGG (n) to PCR of the general technology. Moreover, there is a problem that in case of the abnormality people, a form is generated even in case of the PCR outcome forming the nucleic acid band which is not nucleic acid band of the fixed size and is very roomily circulated of a form or unable to forming the nucleic acid band itself. It has the case of unable to forming the nucleic acid band according to the condition of the nucleic acid which is extracted even by having in case of the normal person and a result is diagnosed. It analyzes but a difficulty follows. Therefore, the specially designed marked technology is requested. And it has the disadvantage that the analysis of on characteristic result of the CGG repetitive sequence is very difficult and it is necessary to have the additional analysis process.
- 13 In this way, as to existing fragile-X syndrome method of diagnosis, the test process was complicated. The consequence analysis was very difficult. And it had different problems of the etc. in which the long time was required.

Technical Challenges of the Invention

- 14 Thus, this inventor diagnosed the fragile-X syndrome. It recognized clearly an inefficiency on the diagnosis by the conventional technique and problems using the same. In order to solve this, it was efficient and the time and cost side completed the favorable method.
- 15 Therefore, the object is that a method provides the method for being exact and conveniently analyzing a plurality of nucleic acid sample materials in comparison with conventional methods in a short time and diagnosing the fragile-X syndrome.

• Structure & Operation of the Invention

- 16 The present invention relates to the method it uses the fragile-X syndrome method of diagnosis using various kinds of DNA probes, and the various kinds of DNA probes which more concretely, can unite with the FMR1 in gene nucleic acid sequence, and it detects the CGG number of occurrence of the FMR1 in gene sequence CGG (n) in the nucleic acid sample material of the listed person for test, and in that way for diagnosing the fragile-X syndrome.
- 17 That is, a method includes the steps as follows :
- 18 (1) The step dissolved, the step that adds the DNA probe of GCC (m) (at this time, a m shows the times, the sense and the step that adds the antisense DNA probe and that the second tracer (it can distinguish with the first tracer) is adhered that the intervening sequence and nucleic acid of (3) FMR1 gene can combine mixed of 2 kind, the sense and the step that adds the antisense DNA probe and that the biotin is adhered that the intervening sequence and nucleic acid of (4) FMR1 gene can combine mixed of 2 kind, the step heating up the mixture of DNA probes and (5) nucleic acid sample material and is degenerated by heat, the step that reacts so that the nucleic acid sample material, the step that injects (7) nucleic acid-DNA probe binding material into the microwell plate, the step washing the microwell plate to (8) cleaning solution and removes the dangling bond nucleic acid and DNA probes, the step reading (9) second tracer and measures the amount of the nucleic acid adhering to the microwell plate, the step reading (10) first tracer and measures the amount of the repetitive sequence CGG (n) within the nucleic acid sample material, and the step producing the CGG number of occurrence n of the sequence CGG (n) from the result of (10) and (11) above statement step (9) within the nucleic acid sample material the nucleic acid sample material extracted from the listed person for test is cut and it processes as the DNA restriction enzyme which specifically cuts the FMR1 gene surrounding. As to the step that adds the DNA probe of GCC (m) (at this time, a m shows the times, the sequence CGG and GCC are repeated. It faces with the fixed number of 10 or 3) and the sequence CGG (m) in which here the first tracer is adhered with (2) and mixed. The step that reacts so that the nucleic acid sample material is thermo

changed (6) specifically unite with DNA probes. As to the step that injects (7) nucleic acid -DNA probe, the streptavidin is fixed to the surface and that the nucleic acid -DNA probe binding material adheres on the microwell plate.

- 29 It has the individual difference as to the sequence CGG (n) in which the nucleotide CGG which is the gene which was with the fragile-X syndrome of the FMR1 in gene 3 is consecutively repeated in case of the normal person. But generally a n is short less than 60 to an extent. However, the length of the CGG (n) excessively shows up in case of the fragility - S syndrome patient and cofactor in comparison with the normal person in a long queue. Therefore, the CGG number of occurrence of the FMR1 in gene sequence CGG (n) can be looked upon with the marker of an otopathy.
- 30 Therefore, the present invention is to provide the method it detects the CGG number of occurrence n of the CGG (n) which is the FMR1 in gene repetitive sequence, and in that way for diagnosing the fragile-X syndrome.
- 31 In a method, it is used with the FMR1 gene and the various kinds of DNA probes specifically can unite. The kind of the tracer adhered with the location combined in the FMR1 gene disagrees.
- 32 As the DNA probe of the GCC (m) and the sequence CGG (m) in which the first tracer is adhered, the DNA probe first used in the step (2) specifically unites with the repetitive sequence CGG (n) of the FMR1 in gene first Exon. The thing in which a m shows the number of occurrence of GCC and sequence CGG as to the DNA probe of the GCC (m) and CGG (m), and generally it uses the DNA probe in which a m is the fixed number of 3-10 in the present invention, and 5 or the to use 6 persons DNA probe, and thing of a m is desirable a m uses 6 persons CGG (6) and GCC (6), that is, the DNA probe of GCCGCCGCCGCCGCCGCC and sequence CGGCGGCGGCGGCGGCGG are the most desirable.
- 33 Moreover, in the step (3), the sense which the intervening sequence and nucleic acid of the FMR1 gene can combine and antisense DNA probe 2 kind are used. This is combined with the second tracer which is the other tracer can distinguish from the first tracer.
- 34 The sense and the antisense DNA probe which the intervening sequence and nucleic acid of the FMR1 gene can combine of 2 kind are used for the another DNA probe in the step (4). These probes are combined with the biotin. It adheres to the surface of the microwell plate in which thereafter a streptavidin is fixed after the nucleic acid sample material and bind. The technology, and the technology and the technology which these unite, it confronts are the general technology explained in literature [the reference : Methods in Enzymology, the Green. N. M., the Vol. XVIII, and the p 148 (1970)] adheres a streptavidin to the surface of the microwell plate adheres to the biotin to the DNA probe. These biotins and streptavidin are possible to use the other means or the materials for instead of fixing on the microwell plate with these as the materials which are used so that the nucleic acid sample material adhere to the microwell plate surface according to the case.
- 35 It is marked by the nucleic acid sample material including the FMR1 gene and the different DNA probes which specifically can unite to the respectively different tracers and thereafter the sense and antisense DNA probe of 2 kinds which the intervening sequence and nucleic acid of the FMR1 gene used in the step (2) and (3) can unite among above-described DNA probes can distinguish with the readout means. It is preferable that it is acceptable even if it uses as a tracer after the nucleic acid combination to be with the conventional material, for example, the conventional material, for example, an enzyme by the enzyme assay method and substrate, the fluorescent material by a fluorometry, the radioactive isotope by a radiometry etc. However, can determine the amount of the nucleic acid sample material and presence through the readout means or the method on characteristic fluorescent material is used. Particularly, in a method, the domain of the radiation and optical extinction uses the fluorescence dye of the different 2 kind, for example, Cy3 and Cy5 as a tracer among fluorescence dyes.
- 36 As to a method, by using the DNA restriction enzyme which specifically can cut the FMR1 gene surrounding in the step (1), the nucleic acid sample material is cut and it disassembles to a plurality of nucleic acid fragments. It is preferable that the *ecoRI*, *mspl*, *eagI*, *bclI*, *taqI*, *hindIII* is usable to the DNA restriction enzyme which specifically can cut the FMR1 gene surrounding. And the middle *EcoRI* is used.
- 37 Various kinds of DNA probes are added after the nucleic acid sample material cut the step (2) or (4) and it mixes.
- 38 In the step (5) among a method, the mixture adding above-described DNA probes in the nucleic acid sample material

fraction cut with the DNA restriction enzyme is degenerated by heat and the nucleic acid sample material and DNA probes of a double-stranded are done so that a single-stranded be. At this time, as to the heat denaturation process of being performed, by heating a mixture in 100°C with for 10 minutes generally it reacts by the DNA heat denaturing method for being performed.

- 39 Thereafter, for example, in 70°C, after react with for 10 minutes and it does with the nucleic acid sample material and DNA probe nucleic acid combination, that is, the hybridization (hybridization) it reacts at the step (6), a reactant is injected into the microwell plate in which a streptavidin is fixed to the surface in the step (7) and the nucleic acid -DNA probe binding material adheres on the microwell plate. The microwell plate is washed after the time out to the conventional cleaning solution, for example, 1X SSC, 0.1% SDS. In that way the nucleic acid fragment unbonded at above statement step (6) and (7) and the step (8) removing DNA probes from the microwell plate are performed.
- 40 A series of process of reading the reaction result through next, the step (9) or (11) performing processess is performed. Concretely, the nucleic acid, adhering to the microwell plate that is, the amount of FMR1 gene containing nucleic acid is measured by reading the second tracer. After the amount of repetitive sequence CGG (n) is measured within the nucleic acid sample material by reading the first tracer, the CGG number of occurrence n of the FMR1 in gene sequence CGG (n) existing within the nucleic acid sample material is produced from these results. In case of using the fluorescent material as a tracer, it is combined according to the conventional cover and interpretation technology [the reference : Methods in Molecular Biology, Paddock, the S. et al., and the Vol. 122. (1996)] in the nucleic acid sample material and the degree of radiation of being generated from the fluorescence dye of the DNA probe which together adheres to the surface of the microwell plate is measured.
- 41 Generally, as to the CGG number of occurrence of the sequence CGG (n) of the normal person, if the number of occurrence measured from the nucleic acid sample material extracted from the listed person for test is 200 time or 60 less than 60 time, it doubts the attack-likelihood of the afterward of the fragile-X syndrome or the future generations. And with being the patient in which the listed person for test suffers from the fragile-X syndrome if it is 200 time or greater it can diagnose.
- 42 The drawing showing the state where the combination of the nucleic acid sample material and DNA probes adheres on the microwell plate in which a streptavidin is fixed with this process to the surface is presented in figs. 3 and 4. In Fig. 4, the DNA probe in which the fluorescence dye Cy5 is adhered is combined in the nucleic acid sample material in comparison with Fig. 3 with large amount. The CGG number of occurrence of the sequence CGG (n) can know the highness within this nucleic acid sample material than the normal value. And the listed person for test extracting this sample is the fragile-X syndrome patient or it is the attack-likelihood of the future generations the cofactor which it potentially has, this is suggestive of the negative principle in nature.
- 43 A method is performed. If angular steps are illustrated around the concrete example, it is the same as that of the next time.
- 44 The nucleic acid sample material extracted from the cell of the listed person for test is processed as the specific DNA restriction enzyme cutting the surrounding of the FMR1 gene and it dissolves. It mixes with the DNA probe of the GCC (6) and the sequence CGG (6), in which the fluorescence dye Cy5 which can be comprised the repetitive sequence CGG (n) and nucleic acid combination reaction of the obtained nucleic acid sample material is adhered the sense and antisense DNA probe of 2 kind etc. and the biotin which the intervening sequence of the sense of 2 kind and antisense DNA probe and the FMR1 gene in which the fluorescence dye Cy3 which the intervening sequence and nucleic acid of the FMR1 gene can combine is adhered and nucleic acid can combine is adhered it heats in 100°C with for 10 minutes and it is degenerated by heat. After it reacts at 70°C with for 10 minutes and it is comprised the nucleic acid sample material and DNA probe nucleic acid combination reaction, since this is injected within the microwell plate in which a streptavidin is coated and the biotin adhered to the DNA probe does specific paring with the streptavidin of the microwell plate surface the nucleic acid sample material is fixed to the microwell plate surface with attach. This microwell plate is washed to the cleaning solution and the dangling bond nucleic acid and DNA probes Naming Alt are removed. By using the read mechanism analyzing the degree of radiation of being generated from the fluorescent material, the intensity of fluorescence of the other wavelength generated from the different fluorescence dye Cy3 and the Cy5 adhered to the nucleic acid -DNA probe binding material of 2 kind is measured. The amount of the nucleic acid adhering to the microwell plate is detected from the fluorescent value generated from the fluorescence dye Cy3 of the DNA probe uniting with the intervening sequence of the FMR1 gene. The CGG (6) and the fluorescent value

generated from the fluorescence dye Cy5 adhered to the GCC (6) are measured and the amount of the repetitive sequence CGG (n) within the nucleic acid fixed to the microwell plate surface is detected. The Cy5 fluorescent value which is high in comparison with the normal person is shown in case of the variation in which the CGG number of occurrence of the sequence CGG (n) existing in the FMR1 in gene within the nucleic acid sample material increases. Two kinds of fluorescent value measured at this kind of method is analyzed and the CGG number of occurrence n of the sequence CGG (n) is produced and through this, the fragile-X syndrome incidence or not and possibility of a patient are determined.

- 45 It is possible that the microwell plate used in a method injects the other sample into each and generally it can test to the plate consisting of 96 small tube wells that the microwell plate used in a method uses. At the same time, it searches a sample more than 90.
- 46 Hereinafter, the present invention is circumstantially illustrated as the embodiment. The following embodiment is provided in order to exemplify the present invention. With limiting the present invention it should not be understood.
- 47 [Embodiment 1] The CGG number of occurrence detection of the FMR1 in gene sequence CGG (n) about the nucleic acid sample material of the normal person.
- 48 The blood was collected from the listed person for test. The nucleic acid was *** extracted in the conventional technology (Sambrook et al. 1989). The nucleic acid sample material extracted was processed in 37°C as EcoRI for 1 hour and the nucleic acid was dissolved with a fraction. In the obtained nucleic acid sample material, the sequence CGG (6) in which Cy5 was adhered and GCC (6), that is, the DNA probe of 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' and 5'-CGGCGGCGGCGGCGGCGG-3', and the sequence 5'-AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA-3', in which Cy3 was adhered the sequence 5'-CGCTGCGGGTGTAACACTGAAACCACGTC-3' in which the DNA probe and biotin of 5'-TGGAGGAGCTGGTGGTGGAAAGTGCAGGGGCT-3' were adhered and DNA probe of 5'-GACGTGGTTTCAGTGTTTACACCGCAGCG-3' were added and it mixed. After this mixture was degenerated by heat been in 100°C for 10 minutes, it reacted at 70°C with for 10 minutes and the association reaction was comprised between nucleic acids. By the nucleic acid sample material passing through the process being injected into the microwell plate in which a streptavidin was fixed to the surface and reacting at 37°C with for 30 minutes the nucleic acid was fixed with a bind between the streptavidin of the biotin of the DNA probe combined in the nucleic acid sample material and the microwell plate surface on the microwell plate. The nucleic acid and DNA probes which were not combined in the reaction process were washed to the cleaning solution, 1X SSC, and 0.1% SDS with 3 times and it removed.
- 49 Thereafter, by measuring the intensity of fluorescence generated from the fluorescence dye Cy3 fixed on the microwell plate which was washed by using the spectrophotofluorometer (Fluoroskan, Labsystems, Finland) in 570nm the amount of the FMR1 gene containing nucleic acid adhering on the microwell plate was measured. By measuring the intensity of fluorescence generated from the fluorescence dye Cy5 in 660nm the amount of the repetitive sequence CGG (n) was measured within the nucleic acid sample material adhering on the microwell plate. The intensity of fluorescence light-emitted from the analyzed result, and Cy3 continued with 198. The intensity of fluorescence light-emitted from Cy5 continued with 1324. ***, the CGG number of occurrence of the sequence CGG (n) was exposed to be about 40 time within the nucleic acid sample material.
- 50 In the nucleic acid sample material collected from the test result, and the listed person for test, it could know that the repetitive sequence CGG (n) of the mean gotten from the normal person existed. Therefore, the listed person for test was determined as the normal person.
- 51 [Embodiment 2] The CGG number of occurrence detection of the FMR1 in gene sequence CGG (n) about the nucleic acid sample material of the fragile-X syndrome patient.
- 52 After the nucleic acid being extracted from the blood sample collected from the listed person for test and using the same method in the above preferred embodiment 1., the association reaction between DNA probes and the nucleic acid sample material were performed, the intensity of fluorescence of Cy5 and fluorescence dye Cy3 was read and the amount of the repetitive sequence CGG (n) was measured within an amount and nucleic acid sample material of the FMR1 gene containing nucleic acid adhering on the microwell plate. ***, the CGG number of occurrence of the sequence CGG (n) was exposed to be 150 time within the nucleic acid sample material.

- 53 In the nucleic acid sample material collected from the test result, and the listed person for test, it could know that the sequence CGG (n) in which CGG was very much repeated existed in comparison with the normal person. Therefore, in the future generations, the listed person for test was diagnosed that it was the cofactor of the fragile-X syndrome in which the fragile-X syndrome was most likely to be attacked.

• Effects of the Invention

- 54 The fragile-X syndrome is diagnosed through the CGG number of occurrence detection of the FMR1 in gene sequence CGG (n). The conventional membrane technique and PCR technique the process is complicated. The long time is required. And it has the disadvantage of the etc. in which the quantity of the sample canning at the same time be tested is restrained. Whereas, as to the method, for detecting the CGG number of occurrence of the sequence CGG (n) relating to the fragile-X syndrome by using various kinds of DNA probes the test process is simple. It is short less than required time drawing 2 hours. And the sample more than 90 can be accurately analyzed at a time and however it is efficient. Moreover, in a method, the microwell plate is used. Therefore, it is effective in the time and cost side using readily trial installations mechanized with the existing read mechanism etc.

• Scope of Claims

Claim[1] :

- 55 (1) The method of diagnosis of the fragile-X syndrome cutting the nucleic acid sample material which extracts from the listed person for test and processes as the DNA restriction enzyme which specifically cuts the FMR1 gene surrounding and includes the step dissolved, the step that adds the DNA probe of the GCC (m) and the sequence CGG (m), the sense and the step that adds the antisense DNA probe and that the second tracer (it can distinguish with the first tracer) is adhered that the intervening sequence, and nucleic acid of (3) FMR1 gene can combine mixed of 2 kind, the sense and the step that adds the antisense DNA probe and that the biotin is adhered that the intervening sequence and nucleic acid of (4) FMR1 gene can combine mixed of 2 kind, the step heating up the mixture of DNA probes and (5) nucleic acid sample material and is degenerated by heat, the step that reacts so that the nucleic acid sample material, the step that injects (7) nucleic acid -DNA probe binding material into the microwell plate, the step washing the microwell plate to (8) cleaning solution and removes the dangling bond nucleic acid and DNA probes, the step reading (9) second tracer and measures the amount of the nucleic acid adhering to the microwell plate, the step reading (10) first tracer and measures the amount of the repetitive sequence CGG (n) within the nucleic acid sample material, and the step producing the CGG number of occurrence n of the sequence CGG (n) from the result of (10) and (11) above statement step (9) within the nucleic acid sample material, and as to the step that adds the DNA probe of the GCC (m) and the sequence CGG (m), here the first tracer is adhered with (2) and mixed; the step that reacts so that the nucleic acid sample material is thermo changed (6) specifically unite with DNA probes; and as to the step that injects (7) nucleic acid -DNA probe, a streptavidin is fixed to the surface and that the nucleic acid -DNA probe binding material adheres on the microwell plate.

Claim[2] :

- 66 The method of claim 1, wherein it is the fluorescence dye in which the first tracer and the second tracer the different absorbance and radiation have a domain to that.

Claim[3] :

- 68 The method of claim 2, wherein the first tracer is Cy5; and the second tracer is Cy3.

Claim[4] :

- 70 The method of claim 1, wherein a m is 5 or 6.

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁶
C12Q 1/68(조기공개)

(11) 공개번호 특2000-0072201
(43) 공개일자 2000년12월05일

(21) 출원번호 10-2000-0047468
(22) 출원일자 2000년08월17일

(71) 출원인 김희태
서울특별시 강남구 청담동 68-19 리버뷰 B/D 306호
(72) 발명자 김희태
서울특별시 강남구 청담동 68-19 리버뷰 B/D 306호
(74) 대리인 이중우
박원용

심사청구: 있음

(54) 여러 종류의 디엔에이 프로브들을 사용한 취약-엑스증후군의 진단 방법

요약

본 발명은 취약-엑스 증후군(Fragile-X syndrome)과 관련이 있는 유전자인 FMR1 유전자내 핵산 서열과 결합할 수 있는 여러 종류의 DNA 프로브(DNA probe)들을 사용하여, 시험 대상자의 핵산 시료에서 FMR1 유전자내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수를 검출함으로써, 취약-엑스 증후군을 진단하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 방법을 사용하면 멤브레인 기법 및 PCR 기법과 같은 종래의 진단 방법들에 비해, 시험 과정이 간단하고, 소요되는 시간도 2 시간 이하로 짧으며, 단 한번에 90개 이상의 시료를 정확하게 분석할 수 있어 시간과 비용면에서 효과적이다.

대표도

도3

색인어

취약-엑스 증후군, FMR1 유전자, DNA 프로브, 반복 서열, 표지물질, 형광 염료, 비오틴, 스트렙타비딘, 마이크로 웰 플레이트, 핵산 시료,

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 종래의 서던 블롯팅(Southern blotting) 기법에 의해 얻어진 결과를 나타내는 멤브레인(membrane)에 대한 도면.

도 2는 종래의 PCR 기법에 의해 얻어진 결과를 나타내는 아가로스(agarose) 또는 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)에 대한 도면.

도 3은 본 발명의 방법에 의해 정상인으로부터 추출된 핵산 시료에 결합된 DNA 프로브(DNA probe)들이, 스트렙타비딘(streptavidin)이 부착된 마이크로 웰 플레이트(micro well plate)상에 고착된 상태를 개략적으로 도시한 마이크로 웰 플레이트 튜브의 측면면도.

도 4는 본 발명의 방법에 의해 취약-엑스 증후군 환자로부터 추출된 핵산 시료에 결합된 DNA 프로브들이, 스트렙타비딘이 부착된 마이크로 웰 플레이트상에 고착된 상태를 개략적으로 도시한 마이크로 웰 플레이트 튜브의 측면면도.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 핵산 시료내에 존재하는 취약-엑스 증후군(Fragile-X syndrome)과 관련된 특이 핵산 서열을 검출함으로써, 취약-엑스 증후군을 진단하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 취약-엑스 증후군과 관련이 있는 유전자인 FMR1 유전자내 핵산 서열과 결합할 수 있는 여러 종류의 DNA 프로브들을 사용하여, 시험 대상자로부터 추출한 핵산 시료에서 FMR1 유전자내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수를 검출함으로써, 취약-엑스 증후군 발병 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다.

취약-엑스 증후군은 정신지체를 나타내는 유전 질환중에서 가장 흔한 질환으로, 전체 정신박약증의 15 내지 20%를 차지하며, 증세로서 불균형적인 외형적 특징외에도, 학습 장애, 언어 장애, 사회적 불안감 등의 정신 지체 현상을 나타내는 심각한 질환이다.

이 질환의 병인에 대한 연구 결과, X 염색체상에 존재하는 FMR1 유전자의 첫 번째 엑손(exon)에는 CGG의 3개의 뉴클레오타이드가 여러 차례 연속적으로 반복된 반복체 CGG(n)가 있으며, 이 서열의 반복 횟수 n이 증가하는 등의 변화가 취약-엑스 증후군을 유발시키는 주요한 원인인 것으로 밝혀진 바 있다[참조: Am J Med Genet, Kaufmann WE, Reiss AL 88(1):11-24(1999, 2)]. 정상인의 경우는, 이러한 CGG 서열이 60회 이하로 반복되어 있으나, 증상은 보이지 않지만 후대에 이 질환을 유전시킬 수 있는 보인자(carrier)의 경우는, 이 서열이 60-200회 정도 반복되어 있으며, 완전 변이가 일어나 CGG 서열이 200회 이상 반복된 경우는 정신지체 증세를 나타내는 취약-엑스 증후군 환자인 것으로 보고되었다.

현재 FMR1 유전자내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수를 분석하기 위한 방법으로 여러 방법들이 이용되고는 있으나, 기술적인 어려움과 결과 해독상의 어려움으로 인하여 보편화되고 있지 못한 형편이다.

취약-엑스 증후군을 진단하는 기존의 방법으로는 FMR1 유전자에 특이적인 핵산 프로브를 부착하여 반복서열 CGG(n)의 길이를 확인하는 서던 블롯팅 기법[참조: Hum Genet, Vaisanen ML, Kahkonen M, Leisti J 93(2):143-7(1994, 2)]과 반복서열 CGG(n)을 증폭하여 결과물의 크기를 분석하는 PCR 기법[참조: Clin Genet, Hecimovic S, Barisic I, Muller A, Petkovic I, Baric I, Ligutic I, Pavelic K;52(3):147-54(1997, 9)] 등이 활용되고 있다.

그 중, 특이적인 핵산 프로브를 사용하는 서던 블롯팅 기법은 시료로부터 추출된 DNA를 특정 DNA 제한효소로 처리, 분해하여 FMR1 유전자의 특정 부위를 절단한후, 이들 DNA 단편들을 겔상에서 전기영동하고 멤브레인상으로 옮겨준 다음, 여기에 표지물질이 부착된 FMR1 유전자 특이 프로브를 첨가하여 핵산결합 반응을 시킨 후, 표지물질 판독을 통해 DNA 단편들의 크기를 분석함으로써 시료내 FMR1 유전자의 변이여부와 그 정도를 검출하는 방법이다. 이 방법은 전과정을 수행하는데 최소 48시간이 소요되어 기본적으로 시험 시간이 지나치게 길다는 문제점과 함께, 시험 과정이 복잡하고 수행상의 어려움 등으로 인한 여러 가지 단점을 가지고 있다.

또다른 기법인 PCR 증폭 기법은 시험 세포로부터 핵산을 추출하고, 여기에 FMR1 유전자내 CGG 반복 부위의 양옆에 결합하여 PCR을 수행할 수 있는 특이 프라이머(primer)를 사용하여 증폭하여 주고, 전기영동 방법을 통해 증폭된 핵산의 길이를 분석하여 반복서열 CGG(n)의 길이를 측정하는 기법으로, 이 경우 증폭 대상 부위의 GC 비율이 거의 100%에 이르기 때문에 일반적인 기술의 PCR로는 증폭이 불가능하다. 또한 비정상인의 경우 PCR 결과물이 일정한 크기의 핵산띠가 아닌 매우 넓게 퍼진 형태의 핵산띠를 형성하거나 핵산띠 자체를 형성하지 못하는 경우도 발생하고, 정상인의 경우에 있어서도 추출된 핵산의 조건에 따라 핵산띠를 형성하지 못하는 경우가 있어서 결과를 판정, 분석하는데 어려움이 따른다는 문제점이 있다. 따라서 특별히 고안된 고도의 기술이 요구되며, CGG 반복서열의 특성상 결과의 분석이 매우 난해하여 추가의 분석 과정이 필요하다는 단점이 있다.

이와 같이, 기존의 취약-엑스 증후군 진단 방법들은 시험 과정이 복잡하고, 결과 분석이 매우 난해하며, 장시간이 소요되는 등의 여러 문제점들을 가지고 있었다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

이에, 본 발명자는 취약-엑스 증후군을 진단하는데 있어, 종래의 기법에 의한 진단상의 비효율성과 이에 따른 문제점들을 인식하고, 이를 해결하고자 효율적이고 시간 및 비용면에서 유리한 본 발명의 방법을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 방법은 종래의 방법들에 비해 단시간에 다수의 핵산 시료를 정확하고 간편하게 분석하여 취약-엑스 증후군을 진단할 수 있는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 여러 종류의 DNA 프로브들을 사용한 취약-엑스 증후군 진단 방법, 더욱 상세하게는 FMR1 유전자내 핵산 서열과 결합할 수 있는 여러 종류의 DNA 프로브들을 사용하여, 시험 대상자의 핵산 시료에서 FMR1 유전자내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수를 검출함으로써, 취약-엑스 증후군을 진단하는 방법에 관한 것이다.

즉, 본 발명의 방법은 다음과 같은 단계들을 포함한다:

- (1) 시험 대상자로부터 추출한 핵산 시료를, FMR1 유전자 주위를 특이적으로 절단하는 DNA 제한효소로 처리하여 분해시키는 단계,
- (2) 여기에, 제 1 표지물질이 부착된 서열 CGG(m) 및 GCC(m)(이때, m은 서열 CGG 및 GCC가 반복되는 횟수를 나타내는 것으로, 3 내지 10의 정수임)의 DNA 프로브를 첨가하여 혼합하는 단계,
- (3) FMR1 유전자의 내부 서열과 핵산 결합할 수 있는, 제 2 표지물질(상기 제 1 표지물질과 구별가능한)이 부착된 2종의 센스 및 안티-센스 DNA 프로브를 첨가하여 혼합하는 단계,
- (4) FMR1 유전자의 내부 서열과 핵산 결합할 수 있는, 비오틴(biotin)이 부착된 2종의 센스 및 안티-센스 DNA 프로브를 첨가하여 혼합하는 단계,
- (5) 상기 핵산 시료와 DNA 프로브들의 혼합물을 가열하여 열변성시키는 단계,
- (6) 열변성된 핵산 시료가 DNA 프로브들과 특이적으로 결합하도록 반응시키는 단계,
- (7) 상기 핵산-DNA 프로브 결합물을, 스트렙티아비딘(streptavidin)이 표면에 고정된 마이크로 웰 플레이트에 주입하여 핵산-DNA 프로브 결합물이 마이크로 웰 플레이트상에 고착되도록 하는 단계,
- (8) 세척 용액으로 마이크로 웰 플레이트를 세척하여 미결합 핵산과 DNA 프로브들을 제거하는 단계,
- (9) 상기 제 2 표지물질을 판독하여 마이크로 웰 플레이트에 고착된 핵산의 양을 측정하는 단계,
- (10) 상기 제 1 표지물질을 판독하여 핵산 시료내 반복서열 CGG(n)의 양을 측정하는 단계,
- (11) 상기 단계 (9) 및 (10)의 결과로부터 핵산 시료내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수 n을 산출하는 단계.

취약-엑스 증후군과 관련있는 유전자인 FMR1 유전자내 3개의 뉴클레오타이드 CGG가 연속적으로 반복된 서열 CGG(n)에 있어, 정상인의 경우는 개인적 차이가 있으나, 일반적으로 n이 60 이하 정도로 짧지만, 취약-엑스 증후군 환자 및 그 보인자의 경우는 CGG(n)의 길이가 정상인에 비해 과도하게 길게 나타난다. 그러므로 FMR1 유전자내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수를 이 질환의 마커(marker)로 볼 수 있다.

따라서, 본 발명은 FMR1 유전자내 반복서열인 CGG(n)의 CGG 반복 횟수 n을 검출함으로써, 취약-엑스 증후군을 진단하는 방법을 제공한다.

본 발명의 방법에서는 FMR1 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 여러 종류의 DNA 프로브들이 사용된다. 그 각각은 FMR1 유전자에 결합되는 위치 및 부착되는 표지물질의 종류가 상이하다.

그 첫번째로, 단계 (2)에서 사용되는 DNA 프로브는 제 1 표지물질이 부착된 서열 CGG(m) 및 GCC(m)의 DNA 프로브로서, FMR1 유전자내 첫번째 엑손의 반복서열 CGG(n)에 특이적으로 결합한다. CGG(m) 및 GCC(m)의 DNA 프로브에 있어서, m은 서열 CGG 및 GCC의 반복 횟수를 나타내는 것으로, 본 발명에서는 일반적으로 m이 3-10의 정수인 DNA 프로브를 사용하며, m이 5 또는 6인 DNA 프로브를 사용하는 것이 바람직하고, m이 6인 CGG(6) 및 GCC(6) 즉, 서열 CGGCGGCGGCGGCGGCGG 및 GCCGCCGCCGCCGCCGCC의 DNA 프로브를 사용하는 것이 가장 바람직하다.

또한, 단계 (3)에서는 FMR1 유전자의 내부 서열과 핵산 결합할 수 있는 센스 및 안티-센스 DNA 프로브 2종이 사용되는데, 이는 제 1 표지물질과 구별할 수 있는 다른 표지물질인 제 2 표지물질과 결합되어 있다.

또다른 DNA 프로브로, FMR1 유전자의 내부 서열과 핵산 결합할 수 있는 2종의 센스 및 안티-센스 DNA 프로브가 단계 (4)에서 사용된다. 이들 프로브는 비오틴과 결합되어 있어, 이후 핵산 시료와 결합후 스트렙티아비딘이 고정된 마이크로 웰 플레이트의 표면에 고착된다. DNA 프로브에 비오틴을 부착하는 기술, 스트렙티아비딘을 마이크로 웰 플레이트의 표면에 부착하는 기술 및 이들이 서로 결합하는 것에 대한 기술은 문헌[참조: Methods in Enzymology, Green. N. M., Vol. XVIII, p148(1970)]에 설명되어 있는 통상적인 기술이다. 이들 비오틴 및 스트렙티아비딘은 핵산 시료가 마이크로 웰 플레이트 표면에 고착되도록 하기 위해 사용된 물질들로, 경우에 따라서는 이들 대신에 마이크로 웰 플레이트상에 고착시키기 위한 다른 수단 또는 물질들을 사용하는 것도 가능하다.

전술한 DNA 프로브들중 단계 (2)와 (3)에서 사용된 FMR1 유전자의 내부 서열과 핵산 결합할 수 있는 2종의 센스 및 안티-센스 DNA

프로브들은 FMR1 유전자를 포함하는 핵산 시료와 특이적으로 결합할 수 있는 서로 다른 DNA 프로브들로, 각기 다른 표지물질들로 표지되어 있어 이후, 판독 수단에 의해 구별할 수 있다. 표지물질로는 핵산 결합후, 판독 수단 또는 방법을 통해 핵산 시료의 양과 존재 여부를 판별할 수 있는 통상의 물질, 예를 들면 효소측정법에 의한 효소 및 기질, 형광측정법에 의한 형광물질, 방사선측정법에 의한 방사성동위원소 등 어떠한 것을 사용하여도 무방하지만, 본 발명의 특성상 형광물질을 사용하는 것이 바람직하다. 특히 본 발명의 방법에서는 표지 물질로서 형광 염료들중 흡광과 발광의 영역이 서로 다른 2종의 형광 염료, 예를 들면 Cy3 및 Cy5를 사용한다.

본 발명의 방법에 있어, 단계 (1)에서는 FMR1 유전자 주위를 특이적으로 절단할 수 있는 DNA 제한 효소를 사용하여 핵산 시료를 절단하여 다수의 핵산 단편으로 분해한다. FMR1 유전자 주위를 특이적으로 절단할 수 있는 DNA 제한 효소로는 EcoRI, MspI, EagI, BclI, TaqI, HindIII가 사용가능하며, 그중 EcoRI를 사용하는 것이 바람직하다.

핵산 시료 절단후에는 단계 (2) 내지 (4)에서와 같이 여러 종류의 DNA 프로브들을 첨가하여 혼합한다.

본 발명의 방법중 단계 (5)에서는 DNA 제한 효소로 절단된 핵산 시료 단편에, 전술한 DNA 프로브들을 첨가한 혼합물을 열변성시켜 이중-가닥의 핵산 시료 및 DNA 프로브들을 단일-가닥이 되도록 한다. 이때 수행되는 열변성 과정은 통상적으로 수행되는 DNA 열 변성 방법으로, 상기 혼합물을 100°C에서 10분간 가열함으로써 반응시킨다.

이후, 예를 들면 70°C에서 10분간 반응시켜 핵산 시료와 DNA 프로브들이 핵산 결합 즉, 혼성화(hybridization)하도록 단계 (6)에서 반응시킨후, 단계 (7)에서 반응물을 스트렙타비딘이 표면에 고정된 마이크로 웰 플레이트에 주입하여 핵산-DNA 프로브 결합물이 마이크로 웰 플레이트상에 고착되도록 한다. 일정 시간 경과후, 마이크로 웰 플레이트를 통상의 세척 용액, 예를 들면 1X SSC, 0.1% SDS로 세척함으로써, 상기 단계 (6) 및 (7)에서 미결합된 핵산 단편과 DNA 프로브들을 마이크로 웰 플레이트로부터 제거하는 단계 (8)을 수행한다.

상기 과정들을 수행한 다음에는, 단계 (9) 내지 (11)을 통해 반응 결과를 판독하는 일련의 과정을 수행한다. 구체적으로, 제 2 표지물질을 판독함으로써 마이크로 웰 플레이트에 고착된 핵산 즉, FMR1 유전자 함유 핵산의 양을 측정하고, 제 1 표지물질을 판독함으로써 핵산 시료내 반복서열 CGG(n)의 양을 측정한 후, 이들 결과로부터, 핵산 시료내에 존재하는 FMR1 유전자내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수 n을 산출한다. 표지물질로서 형광물질을 사용하는 경우에는 통상의 표지 및 판독기술[참조: Methods in Molecular Biology, Paddock, S. et al., Vol. 122. (1996)]에 따라 핵산 시료에 결합되어 마이크로 웰 플레이트의 표면에 함께 고착된 DNA 프로브의 형광 염료로부터 발생하는 발광 정도를 측정한다.

일반적으로, 정상인의 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수는 60회 이하로, 시험 대상자로부터 추출된 핵산 시료로부터 측정된 반복 횟수가 60 내지 200회이면, 취약-엑스 증후군의 추후 또는 후대의 발병 가능성을 의심해 볼 수 있으며, 200회 이상이면 시험 대상자가 취약-엑스 증후군을 앓고 있는 환자인 것으로 진단할 수 있다.

이러한 과정에 의해 스트렙타비딘이 표면에 고정된 마이크로 웰 플레이트상에 DNA 프로브들과 핵산 시료의 결합물이 고착된 상태를 예시한 도면이 도 3 및 도 4에 제시되어 있다. 도 4에서는 핵산 시료에, 형광 염료 Cy5가 부착된 DNA 프로브가 도 3에 비해 다량 결합되어 있어, 이 핵산 시료내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수가 정상치보다 높음을 알 수 있으며, 이는 이 시료를 추출한 시험 대상자가 취약-엑스 증후군 환자이거나 후대의 발병 가능성을 잠재적으로 가지고 있는 보인자임을 시사한다.

본 발명의 방법을 실시하는데 있어, 구체적인 예를 중심으로 각 단계들을 설명하면 다음과 같다.

시험 대상자의 세포로부터 추출된 핵산 시료를 FMR1 유전자의 주위를 자르는 특정한 DNA 제한효소로 처리하여 분해시키고, 수득된 핵산 시료의 반복서열 CGG(n)과 핵산 결합 반응을 이룰 수 있는 형광 염료 Cy5가 부착된 서열 CGG(6) 및 GCC(6)의 DNA 프로브, FMR1 유전자의 내부 서열과 핵산 결합할 수 있는 형광 염료 Cy3가 부착된 2종의 센스 및 안티-센스 DNA 프로브 및 FMR1 유전자의 내부 서열과 핵산 결합할 수 있는 비오틴이 부착된 2종의 센스 및 안티-센스 DNA 프로브 등과 혼합하여 100°C에서 10분간 가열하여 열변성시켜 주고, 70°C에서 10분간 반응시켜 핵산 시료와 DNA 프로브들이 핵산 결합 반응을 이룰 수 있도록 한 후, 이를 스트렙타비딘이 코팅된 마이크로 웰 플레이트내에 주입하여 DNA 프로브에 부착된 비오틴이 마이크로 웰 플레이트 표면의 스트렙타비딘과 특이 결합하도록 함으로써 핵산 시료가 마이크로 웰 플레이트 표면에 부착, 고정되도록 한다. 이 마이크로 웰 플레이트를 세척 용액으로 세척하여 남아있는 미결합 핵산과 DNA 프로브들을 제거하여 주고, 형광물질로부터 발생하는 발광 정도를 분석할 수 있는 판독 기구를 사용하여 핵산-DNA 프로브 결합물에 부착된 2종의 서로 다른 형광 염료 Cy3 및 Cy5로부터 발생하는 다른 파장의 형광도를 측정한다. FMR1 유전자의 내부 서열과 결합한 DNA 프로브의 형광 염료 Cy3로부터 발생된 형광 수치로부터 마이크로 웰 플레이트에 고착된 핵산의 양을 검출하고, CGG(6) 및 GCC(6)에 부착된 형광 염료 Cy5로부터 발생된 형광 수치를 측정하여 마이크로 웰 플레이트 표면에 고정된 핵산내의 반복서열 CGG(n)의 양을 검출한다. 핵산 시료내의 FMR1 유전자내에 존재하는 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수가 증가된 변이의 경우, 정상인에 비하여 높은 Cy5 형광 수치를 나타내게 된다. 이와 같은 방법으로 측정된 두 종류의 형광 수치를 분석하여 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수 n을 산출하고 이를 통해 환자의 취약-엑스 증후군 발병 여부 및 그 가능성을 판정한다.

본 발명의 방법에서 사용하는 마이크로 웰 플레이트는 통상적으로 사용하는 96개의 작은 튜브 웰로 이루어진 플레이트로, 각각에 다른

시료를 주입하여 시험할 수 있어, 90개 이상의 시료를 동시에 검색하는 것이 가능하다.

이하, 본 발명을 실시예로서 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공된 것으로, 본 발명을 한정하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[실시예 1] 정상인의 핵산 시료에 대한 FMR1 유전자내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수 검출

시험 대상자로부터 혈액을 채취하고, 이로부터 통상의 기술(Sambrook et al. 1989)로 핵산을 추출하였다. 추출한 핵산 시료를 EcoRI로 37°C에서 1시간 동안 처리하여 핵산을 단편으로 분해시켰다. 수득된 핵산 시료에, Cy5가 부착된 서열 CGG(6) 및 GCC(6) 즉, 5'-CGGCGGCGGCGGCGGCGG-3' 및 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCC-3'의 DNA 프로브, Cy3가 부착된 서열 5'-AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' 및 5'-TGGAGGAGCTGGTGGTGGGAAGTGCAGGGGCT-3'의 DNA 프로브, 및 비오틴이 부착된 서열 5'-CGCTGCGGGTGTAAACACTGAAACCACGTC-3' 및 5'-GACGTGGTTTCAGTGTTCACCCGCAGCG-3'의 DNA 프로브를 첨가하여 혼합하고, 이 혼합물을 100°C에서 10분간 열변성시킨 후, 70°C에서 10분간 반응시켜 핵산들간에 결합 반응이 이루어지도록 하였다. 상기 과정을 거친 핵산 시료를 스트렙타아비딘이 표면에 고정된 마이크로 웰 플레이트에 주입하여 37°C에서 30분간 반응시킴으로써 핵산 시료에 결합된 DNA 프로브의 비오틴과 마이크로 웰 플레이트 표면의 스트렙타아비딘간의 결합에 의해 핵산을 마이크로 웰 플레이트상에 고착시켰다. 상기 반응 과정에서 결합되지 않은 핵산과 DNA 프로브들을 세척 용액, 1X SSC, 0.1% SDS로 3회 세척하여 제거하였다.

이후, 형광광도계(Fluoroskan, Labsystems, Finland)를 사용하여 세척된 마이크로 웰 플레이트상에 고정된 형광 염료 Cy3로부터 발생하는 형광도를 570nm에서 측정함으로써 마이크로 웰 플레이트상에 고착된 FMR1 유전자 함유 핵산의 양을 측정하고, 형광 염료 Cy5로부터 발생하는 형광도를 660nm에서 측정함으로써 마이크로 웰 플레이트상에 고착된 핵산 시료내 반복서열 CGG(n)의 양을 측정하였다. 분석 결과, Cy3으로부터 발광된 형광도는 198 이었고, Cy5로부터 발광된 형광도는 1324 이었다. 이로부터 핵산 시료내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수는 약 40회인 것으로 나타났다.

상기 시험 결과, 시험 대상자로부터 채취한 핵산 시료에는 정상인으로부터 얻은 평균치의 반복서열 CGG(n)이 존재함을 알 수 있었다. 따라서, 시험 대상자는 정상인으로 판정되었다.

[실시예 2] 취약-엑스 증후군 환자의 핵산 시료에 대한 FMR1 유전자내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수 검출

시험 대상자로부터 채취한 혈액 시료로부터 핵산을 추출하고 상기 실시예 1에서와 동일한 방법을 사용하여 핵산 시료와 DNA 프로브들간의 결합 반응을 수행한 후, 형광 염료 Cy3 및 Cy5의 형광도를 판독하여 마이크로 웰 플레이트상에 고착된 FMR1 유전자 함유 핵산의 양과 핵산 시료내 반복서열 CGG(n)의 양을 측정하였다. 이로부터 핵산 시료내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수는 150회인 것으로 나타났다.

상기 시험 결과, 시험 대상자로부터 채취한 핵산 시료에는 정상인에 비해 CGG가 많이 반복된 서열 CGG(n)이 존재함을 알 수 있었다. 따라서, 시험 대상자는 후대에서 취약-엑스 증후군이 발병될 가능성이 큰 취약-엑스 증후군의 보인자인 것으로 진단되었다.

발명의 효과

FMR1 유전자내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수 검출을 통해 취약-엑스 증후군을 진단하는데 있어서, 종래의 멤브레인 기법 및 PCR 기법은 그 과정이 복잡하고, 장시간이 소요되며, 동시에 시험 가능한 시료의 수량이 제한되는 등의 단점을 가지고 있는데 반해, 여러 종류의 DNA 프로브들을 사용하여 취약-엑스 증후군과 관련된 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수를 검출하는 본 발명의 방법은 시험 과정이 간단하고, 소요되는 시간도 2시간 이하로 짧으며, 단 한번에 90개 이상의 시료를 정확하게 분석할 수 있어 효율적이다. 또한 본 발명의 방법에서는 마이크로 웰 플레이트를 이용하므로, 기존의 판독 기구 등 기계화된 시험 설비들을 용이하게 이용할 수 있는 등 시간 및 비용면에서 효과적이다.

(57) 청구의 범위

청구항1

- (1) 시험 대상자로부터 추출한 핵산 시료를, FMR1 유전자 주위를 특이적으로 절단하는 DNA 제한효소로 처리하여 분해시키는 단계,
- (2) 여기에, 제 1 표지물질이 부착된 서열 CGG(m) 및 GCC(m)(이때, m은 서열 CGG 및 GCC가 반복되는 횟수를 나타내는 것으로, 3 내지 10의 정수임)의 DNA 프로브를 첨가하여 혼합하는 단계,
- (3) FMR1 유전자의 내부 서열과 핵산 결합할 수 있는, 제 2 표지물질(상기 제 1 표지물질과 구별가능한)이 부착된 2종의 센스 및 안티-센스 DNA 프로브를 첨가하여 혼합하는 단계,
- (4) FMR1 유전자의 내부 서열과 핵산 결합할 수 있는, 비오틴이 부착된 2종의 센스 및 안티-센스 DNA 프로브를 첨가하여 혼합하는 단계,

- (5) 상기 핵산 시료와 DNA 프로브들의 혼합물을 가열하여 열변성시키는 단계,
- (6) 열변성된 핵산 시료가 DNA 프로브들과 특이적으로 결합하도록 반응시키는 단계,
- (7) 상기 핵산-DNA 프로브 결합물을, 스트렙타비딘이 표면에 고정된 마이크로 웰 플레이트에 주입하여 핵산-DNA 프로브 결합물이 마이크로 웰 플레이트상에 고착되도록 하는 단계,
- (8) 세척 용액으로 마이크로 웰 플레이트를 세척하여 미결합 핵산과 DNA 프로브들을 제거하는 단계,
- (9) 상기 제 2 표지물질을 판독하여 마이크로 웰 플레이트에 고착된 핵산의 양을 측정하는 단계,
- (10) 상기 제 1 표지물질을 판독하여 핵산 시료내 반복서열 CGG(n)의 양을 측정하는 단계,
- (11) 상기 단계 (9) 및 (10)의 결과로부터 핵산 시료내 서열 CGG(n)의 CGG 반복 횟수 n을 산출하는 단계를 포함하는 취약-엑스 증후군(Fragile-X syndrome)의 진단 방법.

청구항2

제 1 항에 있어서,

상기 제 1 표지물질과 제 2 표지물질이 서로 다른 흡광도와 발광도 영역을 갖는 형광 염료인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항3

제 2 항에 있어서,

상기 제 1 표지물질이 Cy5이고, 제 2 표지물질이 Cy3인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항4

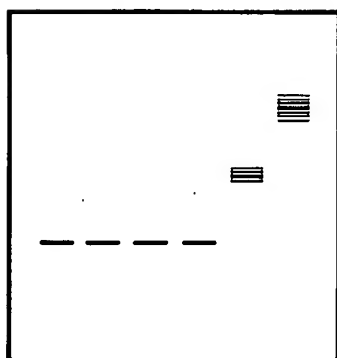
제 1 항에 있어서,

상기 m이 5 또는 6인 것을 특징으로 하는 방법.

도면

도면1

1 2 3 4 5 6



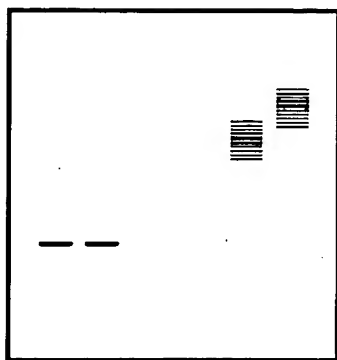
레인 1-4 : 정상 샘플

레인 5 : 변이된 샘플

레인 6 : 완전 변이된 샘플

도면2

1 2 3 4 5 6



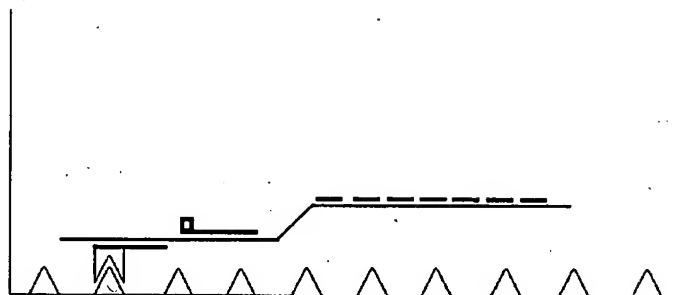
레인 1-2 : 정상 샘플

레인 3-4 : 확인 불가능 샘플

레인 5 : 변이된 샘플

레인 6 : 완전 변이된 샘플

도면3



마이크로 웰 플레이트 표면에 고정된 스트렙트아비딘.



비오틴이 부착된 DNA 프로브

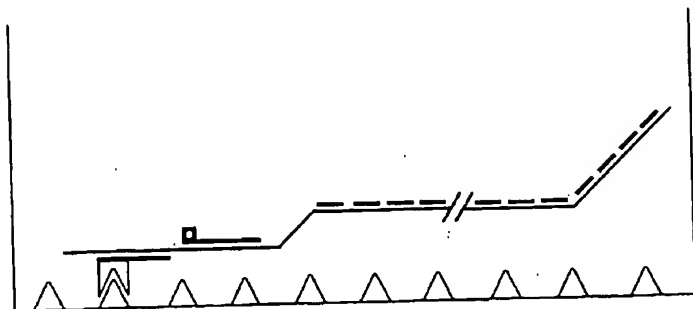


형광 염료 Cy3가 부착된 DNA 프로브



형광 염료 Cy5가 부착된 DNA 프로브 (CGG(6)+Cy5, GCC(6)+Cy5)

도면4



마이크로 웰 플레이트 표면에 고정된 스트렙트아비딘.



비오틴이 부착된 DNA 프로브



형광 염료 Cy3가 부착된 DNA 프로브



형광 염료 Cy5가 부착된 DNA 프로브 {CGG(6)+Cy5, GCC(6)+Cy5}